

Aus der Kinderklinik der Freien Universität Berlin
Kaiserin Auguste Viktoria Haus
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. H. Helge

Der Effekt von Chloramphenicol und
Thiamphenicol *in vivo*
auf das Wachstum von Sarkomen
und Leukosen der Maus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Weizsäcker
aus Pforzheim

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Kinderklinik der Freien Universität Berlin
Kaiserin Auguste Viktoria Haus
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. H. Helge

Der Effekt von Chloramphenicol und
Thiamphenicol *in vivo*
auf das Wachstum von Sarkomen
und Leukosen der Maus

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Weizsäcker
aus Pforzheim

Referent: Prof. Dr. med. Burghard Stück

Koreferent: Prof. Dr. med. Immo Hoppe



Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 19.10.1976

Inhaltsangabe

1. Einleitung	S. 1
2. Material und Methoden	S. 6
2.1 Tiere	S. 6
2.2 Tumoren	S. 6
2.3 Tumoraufbereitung und -implantation	S. 7
2.4 Präparate	S. 8
2.5 Behandlungsschema	S. 8
2.6 Verlauf und Beobachtung	S. 9
2.7 Cytotoxischer Test zum Nachweis humoraler Antikörper in Antiseren	S. 10
3. Ergebnisse	S. 11
3.1 Versuche zur Ermittlung der subakuten Toxi- zität von CAPH und TAPH für BALB/c-Mäuse	S. 11
3.2 Versuche zur hemmenden Wirkung von CAPH, TAPH und OKAMAT auf das Wachstum verschie- dener Sarkome und Leukosen der Maus	S. 13
3.2.1 Methylcholanthren induzierter Tumor BALB/c♀ Meth A	S. 14
3.2.2 Dimethylbenzanthracen induzierter Tumor C57BL/6 EL4	S. 19
3.2.3 Spontan entstandene Leukose BALB/c♀ SL4	S. 22
3.2.4 Strahleninduzierte Leukose C57BL/6♀ ERLD	S. 25
3.2.5 RAUSCHER-Virus induzierte Leukosen	S. 26
3.3 Beobachtungen und Versuche, welche auf die immunologische Reaktionsbereitschaft von BALB/c-Mäusen bei CAPH- bzw. TAPH-Behandlung schließen lassen	S. 28
3.3.1 Charakteristik der Gewichtsverläufe BALB/c♀ Meth A Tumor-tragender Tiere während der Behandlung	S. 28

3.3.2 Messung der Titer humoraler Antikörperbildung ($H2^d$ anti $H2^b$) unter TAPH-Behandlung in unterschiedlicher Dosierung	S. 30
3.3.3 Reaktion der Tiere (immunolog. Sekundärantwort) auf eine 2. Tumorzellgabe 6 Wochen nach der Erstimplantation	S. 30
4. Diskussion	S. 32
5. Zusammenfassung	S. 43
6. Literatur	S. 45

1. E i n l e i t u n g

Chloramphenicol (im folgenden: CAPH) wurde 1948 eingeführt und bewährte sich als Antibiotikum mit breitem Wirkungsspektrum. Thiamphenicol (im folgenden: TAPH) ist ein Thio-Derivat Chloramphenicols und wird ebenfalls zur antibakteriellen Therapie verwendet.

Das Interesse der T u m o r f o r s c h u n g an CAPH wurde durch Arbeiten geweckt, denenzufolge das Präparat i n v i t r o in den Stoffwechsel von schnell proliferierenden Warmblüterzellen eingreift: HARTMAN (11) zeigte z.B., daß die Proliferationsgeschwindigkeit von Maus-Myelomzellen schon bei niedrigen CAPH-Dosen (50 μ /ml) abnimmt.

Das chemotherapeutische Prinzip CAPHs beruht auf der selektiven Hemmung b a k t e r i e l l e r Proteinsynthese. Die minimale Hemmkonzentration liegt für die meisten Keime i n v i t r o zwischen 0,75 und 12 μ /ml (6).

Daß CAPH in Warmblüterzellen die c y t o p l a s m a - t i s c h e Proteinsynthese hemmt, wurde lange Zeit angenommen (34). Neue Arbeiten konnten dies jedoch nicht bestätigen (31,36).

Dagegen wurde ein hemmender Effekt selbst niedriger CAPH-Dosen auf die m i t o c h o n d r i e l l e Proteinsynthese in Warmblüterzellen nachgewiesen (14,18,28,29):

Während die Hemmung der bakteriellen Proteinsynthese auf der Bindung CAPHs an ein spezielles Protein der 50-S-Ribosomenuntereinheit beruht (26), ist der molekulare Mechanismus der Hemmung mitochondrieller Proteinsynthese noch ungeklärt. Ein ähnlicher Vorgang wie im Bakterium scheint möglich, da Organell und Mikrobe in Morphologie und molekularen Strukturen zum Teil übereinstimmen (Endosymbiontentheorie) (19).

Meßbar wird unter der Einwirkung von CAPH auf die mitochondrielle Proteinsynthese ein Absinken der C y t o -

c h r o o x i d a s e aktivität in der Zelle. CAPH hemmt die De-novo-Synthese dieses Enzyms, die zum Teil intramitochondriell stattfindet. (Dazu vorliegende Arbeiten sind am Ende der Einleitung zusammengestellt - Tab. I).

Eine Hemmung der Cytochromoxidasesynthese wird für die Zelle dann bedeutsam, wenn es dadurch zu einem Abfall der mitochondriellen ATP-Synthese kommt (8). Da alle stoffwechselintensiven Prozesse in der Zelle, wie z.B. die Zellproliferation, einen hohen ATP-Bedarf haben, ist es vorstellbar, daß CAPH durch Beeinträchtigung der ATP-Synthese einer Zelle indirekt auch deren Proliferation hemmt:

FIRKIN und LINNANE (8) beschreiben eine Hemmung der Cytochromoxidase-Synthese von HeLa-Zellen *in vitro* bei CAPH-Konzentrationen von 20 μ /ml; mit ansteigender CAPH-Konzentration (100-150 μ /ml) sank die Atemaktivität und die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellkolonie.

LIBERMAN und ROTI ROTI (16,17) wiesen für Leukosezellen der Maus eine deutliche Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit bei CAPH (50 μ /ml) *in vitro* nach. HARTMAN (11) zeigte, daß die Proliferationsgeschwindigkeit von Maus-Myelomzellen bei CAPH-Konzentrationen von 50 μ /ml absinkt.

Die CAPH-Wirkung auf Warmblüterzellen betrifft also in erster Linie proliferierende Zellen; sie hat " c y t o - s t a t i s c h e n " Charakter.

Da Tumorzellen des hämatopoetischen Systems vermutlich schnell proliferieren, wurde in dieser Arbeit die Beeinflussung ihres Wachstums durch CAPH oder TAPH *in vitro* untersucht.

Im lebenden Organismus ist Tumorzellwachstum der Immunabwehr unterworfen. Das Funktionieren dieses Abwehrsystems setzt die uneingeschränkte Proliferation immunaktiver Zellen voraus.

Daß es unter CAPH-Einwirkung zu einer Proliferationshemmung auch dieser Zellen kommen kann, geht aus Arbeiten zur

immunsuppressiven Wirkung CAPHs und seines Derivats TAPH hervor. (Eine Übersicht findet sich am Ende der Einleitung - Tab. II)

Die vorliegende Arbeit soll daher folgende drei Fragen beantworten:

- 1.) Wird das Wachstum verschiedener Sarkome und Leukosen der Maus durch Chloramphenicol oder sein Derivat Thiamphenicol *in vivo* gehemmt?
- 2.) Wird die Aktivität des Immunsystems der verwendeten Tiere durch Chloramphenicol oder Thiamphenicol *in vivo* gehemmt?
- 3.) Sollten sowohl Tumorwachstum als auch Immunaktivität beeinflußt werden, inwieweit überwiegt dann der Hemmeffekt auf das Tumorwachstum den Hemmeffekt auf das Immunsystem?

Im Verlaufe der Versuche wurde die Substanz OXAMAT - als Glykolysehemmer *in vitro* bekannt (24,25) - mitverwendet, um zu testen, ob die Substanz allein oder in Kombination mit TAPH das Wachstum der Tumorzellen *in vivo* hemmt.

Tab.: I Zusammenstellung von Arbeiten über die Hemmung der Cytochromoxydase-Aktivität durch CAPH oder sein Derivat TAPH

In vitro:				
Zelltyp	Konzentration im Kulturmedium	gehemmte Cytochrome	Hemmung der Aktivität zu	Autor
HeLa-Zellen	CAPH: 20 μ /ml	a, a ₃ / b/ c ₁	80%	(8)
L-Zellen der Maus (Earle's Fibroblasten)	CAPH: 10 μ /ml	a, a ₃ / b/ c ₁	10 - 100%	(7)

I n v i v o :

Gewebstyp	applizierte Dosis	gehemmte Cytochrome	Hemmung der Aktivität zu	Autor
regenerierende Leber (Ratte)	CAPH: 100 - 200 mg/kg/Tg	a, a ₃	40%	(9)
" "	CAPH: 1000mg/kg/Tg	a, a ₃	43%	(21)
Knochenmark (Meerschweinchen)	TAPH: 100mg/kg/Tg	a, a ₃	bis zu 50% in Abhängigkeit von der Zellreife	(21)
Embryonalzellen(Ratte)	TAPH: 300mg/kg/Tg	a, a ₃	80%	(21)

Tab.: II Zusammenstellung von Arbeiten über die Wirkung CAPHs und seines Derivats TAPH auf das immunologische System des Warmblüters

I n v i t r o :

Gewebs-/Zelltyp	Konzentration im Kulturmedium	Hemmung der:	Autor
Lymphknotenfragmente (Kaninchen)	CAPH: 50 y/ml	Antikörper-Synthese, z.T. Sekundärantwort	(1)
Milzzellen (Kaninchen)	CAPH: 20 - 50 y/ml	Plauebildung, Antikörper-Synthese (PA)	(33)
Myelomzellen (Maus)	CAPH: 50 y/ml	Zellproliferation	(11)

In vivo :

Gewebs-/Zelltyp	Dosis bzw. Serum- konzentration	Hemmung der:	Autor
Antikörperprodu- zierendes System/ Hauttransplantat (Kaninchen)	CAPH: 600 mg/kg/Tg TAPH: 100 mg/kg/Tg	Antikörpersynthese (PA) Transplantatabstos- sung	(35)
Antikörperprodu- zierendes System (Kaninchen)	CAPH: 10 y/ml	intrazell.u.humora- le Antikörper (PA); Mitose-Aktivität Antikörperproduzie- render Zellen	(30)
Antikörperprodu- zierendes System (Kaninchen)	CAPH/TAPH: 100 mg/kg/Tg	Antikörpersynthese (PA)	(27)
Antikörperprodu- zierendes System (Mensch)	CAPH: 4 g/Tg	Anti-Tetanustoxoid- bildung	(4)

2. Material und Methoden

2.1 Tiere

Als Tumorträger wurden Inzuchtmäuse der Stämme BALB/c und C57BL/6 verwendet.

Die Tiere stammen aus Inzuchtlinien, die der Kinderklinik der FU Berlin aus dem Laboratorium von Prof. Dr. OLD und Prof. Dr. BOYSE (SLOAN-KETTERING INSTITUTE, New York) 1965 zur Verfügung gestellt wurden.

Die Züchtung erfolgte weiterhin in strenger Bruder-Schwester-Paarung. Die genetische Homogenität wurde regelmäßig durch Hauttransplantationen überprüft.

Es wurden Versuchsgruppen von 10 oder 15 Tieren gebildet. Die weiblichen bzw. männlichen Tiere waren 12 bis 16 Wochen alt, hatten durchschnittlich ein Gewicht von 20 g und wurden mit ALTROMIN^R und Wasser ad libitum ernährt.

2.2 Tumoren

a) BALB/c φ METH A-Aszites in der 530.-550. Passage
Der Primärtumor wurde 1962 durch eine Subkutaninjektion von 0,1 mg 3-Methylcholanthren in weiblichen BALB/c-Mäusen induziert (23,32). Nach einer drei- bis achtmonatigen Latenzzeit trat bei 90% der Tiere ein subkutan wachsender Tumor auf, bei dem es sich histologisch um ein Fibrosarkom handelte. Die Primärtumoren wurden mechanisch zerkleinert in BALB/c-Mäuse überimpft, so daß sie in Form von Tumorlinien erhalten blieben. Eine dieser Tumorlinien trat nach mehrmaliger Passage als Aszites auf (BALB/c φ METH A). Die fortlaufenden Passagen wurden intraperitoneal vorgenommen. Im Abstand von acht Tagen trat ein goldgelber zellreicher Aszites auf, der nur wenige tote Zellen enthielt.

b) C57BL/6 EL4 (32) in der 198.-205. Passage
Es handelt sich um einen durch 10-Dimethyl-1,2-benzanthracen induzierten Leukoseaszites bei C57BL/6-Mäusen. Die Passagen des Tumors wurden intraperitoneal vorgenommen. Der Aszites wuchs innerhalb von 8 bis 10 Tagen.

c) C57BL/6♀ ERLD (32) in der 204. Passage

Diese Leukose wurde in weiblichen C57BL/6-Mäusen durch Röntgenstrahlen induziert. Die Passagen des Tumors wurden intraperitoneal vorgenommen. Der Aszites wuchs innerhalb von 12 Tagen.

d) BALB/c♀ SL4 (32) in der 64.-80. Passage

Diese Leukose ist in weiblichen BALB/c-Mäusen spontan entstanden. Die Leukose wurde in Passage gehalten, indem der in 6 bis 10 Tagen wachsende Milztumor - mechanisch zerkleinert und in Kochsalzlösung aufgeschwemmt - intraperitoneal verpflanzt wurde.

e) BALB/c♀ RAUSCHER-Virus induzierte Leukosen in der 212. Passage

Dieser Tumor tritt nach einer Infektion durch RAUSCHER-Virus mit einer Latenzzeit von etwa 20 Tagen als Leukose auf. Charakteristisch ist das Aufschießen eines sehr grossen Milztumors.

Die Passagen erfolgten entweder über das Plasma infizierter Tiere oder durch intraperitoneale Inokulation des zerkleinerten und aufgeschwemmten Milztumors.

2.3 Tumoraufbereitung und -implantation

Das Tumormaterial wurde aus den Passagetieren nach Eröffnen des Situs durch Absaugen des Aszites (bei BALB/c♀ METH A und C57BL/6 EL4) oder durch Exstirpation der Milz (bei BALB/c♀ SL4 und RAUSCHER-Virus induzierten Leukosen) gewonnen. Die Milzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung mechanisch zerkleinert.

Tumorzellen aus dem Aszites bzw. aus der Milz wurden dann in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und zweimal gewaschen bei Verwerfen des Überstands mit Kapillarpipetten.

Das Zellsediment wurde zuletzt bei 200 U/min. zentrifugiert, in der THOMA-Zählkammer mit Trypanblau auf Vitalität geprüft und mit physiologischer Kochsalzlösung auf die gewünschte Zellkonzentration gebracht. Es wurden nur solche Zellkonzentrate verwendet, die weniger als 10% toter Zellen aufwiesen.

Diese Suspensionen wurden den Tieren in 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung intraperitoneal implantiert.

Den Tiergruppen der RAUSCHER-Virus-"Plasma"-induzierten Leukose wurden je 0,25 ml Plasma infizierter Tiere intraperitoneal injiziert.

2.4 Präparate (bzw. Substanz)

Chloramphenicol:

Das Präparat PARAXIN^R der Firma BOEHRINGER-MANNHEIM ist Chloramphenicol-Monosuccinat-Natrium.

Chemisch: D(-)threo-2-dichloracetamido-1-p-nitrophenyl-1,3-propandiol

Das Präparat wurde in Aqua bidest. gelöst und mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt.

Thiamphenicol:

Als Thiamphenicolderivat stand das Präparat URFAMYCIN^R, ein Thiamphenicol-Glycinat, der Firma ZAMBON-Vicenza, Italien zur Verfügung.

Chemisch: D(+)threo-1-(4-methylsulfonylphenyl)-1-hydroxy-2-dichloracetamido-3-aminoacetoxypropan-hydrochlorid

Es wurden Kochsalzlösungen des Präparats verwendet.

Oxamat:

OXAMAT-Natriumsalz der Firma EGA-Chemie (Steinheim) stand zur Verfügung. OXAMAT (Formel: $H_2N-CO-COOH$) ist strukturanalog zu Pyruvat (24).

Das Präparat ging in physiologischer Kochsalzlösung in Lösung.

Zur Behandlung der Kontrolltiere wurde physiologische Kochsalzlösung in entsprechender Menge verwendet.

2.5 Behandlungsschema

CAPH wurde in einer Dosis von 700 bzw. 900 mg/kg/Tg appliziert: Zunächst erhielten die Tiere 2 Einzeldosen/Tg im Abstand von 12 Stunden. Wegen der schnellen Ausscheidung

von CAPH bei Nagetieren, die in der Literatur beschrieben ist (21), war es schwierig, eine ausreichende hohe CAPH-Konzentration permanent aufrechtzuerhalten. Deshalb wurde CAPH in weiteren Versuchen in 4 Einzeldosen/Tg appliziert.

TAPH wurde in Dosen von 450, 700 und 900 mg/kg/Tg appliziert. Die Tiere erhielten 2 Einzeldosen/Tg im Abstand von 12 Stunden.

CAPH und TAPH wurden subkutan wie auch intraperitoneal verabreicht (siehe Tabellen, Spalte 5).

OXAMAT wurde in 2 Einzeldosen zu 0,75 g/kg/Tg intraperitoneal verabreicht. Ferner wurde eine Gabe von TAPH (2x 350 mg/kg/Tg) mit einer Gabe von OXAMAT (2x 0,75 g/kg/Tg) kombiniert.

Behandlungsbeginn:

Um einen günstigen therapeutischen Spiegel zum Zeitpunkt der Tumorimplantation zu erreichen, wurde die Behandlung der Tiere mit CAPH oder TAPH zunächst 24 Stunden bis 5 Tage vor der Tumorimplantation begonnen (siehe Tabellen, Spalte 3, mit (+) bezeichnete Werte).

Nachdem bei dieser Verfahrensweise eine Hemmung des Tumorstwachstums erzielt werden konnte, wurde dazu übergegangen, verzögert zu behandeln, d.h. CAPH oder TAPH erst 24 bzw. 48 Stunden nach der Tumorimplantation erstmals zu injizieren (siehe Tabellen, Spalte 3, mit (-) bezeichnete Werte).

2.6 Verlauf und Beobachtung

Die Applikation der Präparate erfolgte über zwei bis vier Wochen.

Alle 4 Tage wurde das Gewicht der Tiere festgehalten. Mit der Inspektion auf Entwicklung eines Aszites und der Palpation nach einem Milztumor ergaben sich zwei weitere Parameter zur Beurteilung des Tumorstwachstums.

Die überlebenden Tiere wurden mindestens drei Monate lang beobachtet.

2.7 Cytotoxischer Test zum Nachweis humoraler Antikörper in Antiseren.

Der cytotoxische Test wurde von GORER und O'GORMAN (10) zum Nachweis von Histoinkompatibilitätsantigenen angegeben.

In der vorliegenden Arbeit wurde er zum Vergleich der Cytotoxizität von Antiseren aus Tieren, deren Immunsystem dem Einfluß von TAPH in unterschiedlicher Dosierung ausgesetzt war, herangezogen.

Es wurden gleiche Mengen (0,3 ml) einer Antiserumverdünnung (in Form einer geometrischen Verdünnungsreihe), einer Zellsuspension (2×10^6 C57BL/6 EL4-Zellen) und einer Komplementverdünnung (Meerschweinchen 1:1) in Rundbodenröhrchen pipetiert. Diese wurden 60 Minuten lang im Wasserbad bei 30°C . inkubiert und anschließend in Eiswasser gesetzt, um die Reaktion zu unterbrechen. Nach Hinzugeben von 0,05 ml einer frisch zubereiteten 0,2%igen Trypanblau-Lösung, die nur von toten Zellen aufgenommen wird, wurden die gefärbten und ungefärbten Zellen in einer Zählkammer getrennt gezählt. Als Maß für die Wirkung der verschiedenen Antiserumverdünnungen diente der Prozentsatz gefärbter Zellen.

Als Titer wurden die Antiserumverdünnungen angegeben, die ca. 50% gefärbte Zellen enthielten.

5. E r g e b n i s s e

3.1 Versuche zur Ermittlung der subakuten Toxizität von CAPH und TAPH für BALB/c-Mäuse

Die subakute Toxizität C A P H s für BALB/c-Mäuse, ermittelt in einem Versuch mit je 10 Tieren bei subkutan applizierten Tagesdosen von 450, 900, 1350 bzw. 1800 mg/kg über 28 Tage, lag bei 1800 mg/kg/Tg (siehe Abb. 1).

Die betroffenen Tiere starben in den ersten Tagen nach Injektionsbeginn. Ein Kumulationsphänomen, wie wir es bei TAPH beobachten konnten, fanden wir bei CAPH-Applikation nicht. Das wird aus der Tatsache heraus verständlich, daß CAPH im Organismus metabolisiert wird: Die Glucoronyltransferase der Leberzelle reagiert mit CAPH, das als Glucoronid in der Galle erscheint (34,35). Unkonjugiert sind nur etwa 5-15% der aufgenommenen CAPH-Menge im Urin nachweisbar (15). Es gibt ferner Anzeichen dafür, daß CAPH seinen eigenen Abbau im Organismus induziert (21), wodurch eine Kumulation dieses Präparats im Organismus ausgeschlossen wäre.

Die subakute Toxizität T A P H s für BALB/c-Mäuse, ermittelt in einem Versuch mit je 10 Tieren bei subkutan applizierten Tagesdosen von 450, 900, 1350 bzw. 1800 mg/kg über 28 Tage, lag zwischen 1350 und 1800 mg/kg/Tg (siehe Abb. 1).

Da 90% der Tiere erst im Verlaufe der Behandlung Toxizitätszeichen boten und starben, nehmen wir an, daß der TAPH-Gehalt im Organismus langsam bis zu einer kritischen Schwelle kumuliert (vergleiche 15). TAPH wird im Organismus weder an Serumprotein gebunden noch inaktiviert; es passiert seine "Ausscheidungsorgane" Leber und Niere und erscheint unverändert in Galle und Harn (6). Die fehlende Bindung an Serumprotein soll sich günstig auf einen schnellen Übertritt ins Gewebe auswirken (6).

Abb. 1: Subakute Toxizität CAPHs und TAPHs für BALB/c-Mäuse bei subkutan applizierten Tagesdosen von 450, 900, 1350 bzw. 1800 mg/kg/Tg über 28 Tage

<u>CAPH-Dosis:</u> (mg/kg/Tg)	Zahl der behandelten Tiere	Zahl der gestorbenen Tiere
450	10	0
900	10	0
1350	10	0
1800	10	7

<u>TAPH-Dosis</u> (mg/kg/Tg)	Zahl der behandelten Tiere	Zahl der gestorbenen Tiere
450	10	0
900	10	0
1350	10	2
1800	10	7

Daß OXAMAT in Dosen bis zu 3 g/kg/Tg (intraperitoneal appliziert) von der Maus toleriert wird, wurde einer Arbeit von PAPACONSTANTINO (25) entnommen.

Der Autor weist darauf hin, daß das Präparat sehr schnell wieder ausgeschieden wird.

Verträglichkeit der Präparate im Verlauf der Versuche:

Bei TAPH-Dosen von 900 mg/kg/Tg und höher traten nach länger als 14tägiger Behandlung Unverträglichkeitszeichen wie Anorexie und Gewichtsverlust auf. Solche Erscheinungen wurden nach niedrigerer TAPH-Dosierung bei gleicher Behandlungsdauer nicht beobachtet.

CAPH-Dosen von 900 mg/kg/Tg bei entsprechender Behandlungsdauer wurden von den Tieren komplikationslos vertragen. Ebenso zeigten sich bei der Applikation von OXAMAT keine Nebenwirkungen.

3.2 Versuche zur hemmenden Wirkung von CAPH, TAPH und OXAMAT auf das Wachstum verschiedener Sarkome und Leukosen der Maus

Versuchsbedingungen und Ergebnisse sind in den Tabellen 1 bis 5 zusammengefaßt, wobei die Versuchsbedingungen aus den Spalten 1 bis 5, die Ergebnisse aus den Spalten 6 bis 10 hervorgehen und im Text in der Reihenfolge dieser Spalten erläutert werden.

Die Hemmwirkung der verwendeten Präparate wird anhand folgender Parameter ermittelt:

$\frac{U_T}{(\%)} = \text{Zahl der überlebenden Tiere in } \% \text{ (Überlebensrate)}$

$\frac{I}{S} = \frac{\text{Zahl der eingegangenen Tiere}}{\text{Zahl der zum jeweiligen Versuch verwendeten Tiere}}$

$\frac{U_d}{(T_g)} = \text{mittl. Überlebensdauer der eingegangenen Tiere in Tagen}$

Bei einigen Versuchsergebnissen wurde die Signifikanz P

($P < 0,05$) der Unterschiede zwischen den Werten der mittleren Überlebensdauer unbehandelter bzw. behandelter Tiere im t-Test ermittelt (5).

3.2.1 Methylcholanthren induzierter Tumor BALB/c♀ METH A BALB/c-Mäusen wurde, obigen Angaben entsprechend, der chemisch induzierte Tumor BALB/c♀ METH A inokuliert. Die Tiere wurden mit CAPH oder TAPH (siehe Tab. 1) behandelt.

Geschlechtsspezifische Unterschiede (Tab. 1, Spalte 1): Weibliche Tiere entwickeln eine bessere Tumorerabwehr als männliche: Aus dem Vergleich der Kontrollgruppenergebnisse untereinander geht hervor, daß nach Gabe einer Tumordosis von 2×10^6 Zellen die Überlebensrate bei weiblichen Tieren im Schnitt höher ist als bei männlichen Tieren (Tab. 1, Spalte 6 a bis g und i).

Behandlungsbeginn (Tab. 1, Spalte 3):

Bei einem Teil der Versuche wurde die Behandlung der Tiere mit CAPH oder TAPH vor der Tumorgabe begonnen, um einen ausreichend hohen Serumspegel zu erreichen. Dagegen mag eingewendet werden, daß frisch applizierte Tumorzellen durch das im Wirt bereits vorhandene cytostatisch wirksame Präparat gleich abgetötet werden könnten. Es galt also zu zeigen, daß eine Hemmung des Tumorstwachstums auch ohne Vorbehandlung der Tiere zustandekommt.

Für die Behandlung mit C A P H läßt sich durch den Vergleich einer vor- und einer verzögert behandelten Gruppe bei sonst gleichen Ausgangsbedingungen zeigen, daß eine 3tägige Vorbehandlung der Tiere zu einer Überlebensrate von 95,3% führt (Tab. 1, Spalte 9 b), während die Überlebensrate bei um 2 Tage verzögert behandelten Tieren mit 50% deutlich darunter lag (Tab. 1, Spalte 9 c).

Bei der Behandlung mit T A P H wurden auch ohne Vorbehandlung hohe Überlebensraten bei den Tieren erzielt. Der Vergleich vor- bzw. verzögert behandelter Gruppen beweist, daß eine Vorbehandlung nicht notwendig ist, um mit TAPH

hohe Überlebensraten zu erzielen (Tab. 1, Spalte 8 e und 8 g).

Behandlungsdauer (Tab. 1, Spalte 4):

Die besten Ergebnisse wurden mit einer Behandlung über 14 Tage (Tab. 1, Spalte 8 c und 8 g), bzw. über 18 Tage (Tab. 1, Spalte 9 b) erzielt. Eine längere Behandlung verbessert die Überlebensrate BALB/c_q Meth A Tumor-tragender Tiere nicht (Tab. 1, Spalte 9 d). Vor allem die mit TAPH behandelten Tiere werden dann durch die Nebenwirkungen des Präparats zu stark geschwächt.

Applikationsform der Präparate (Tab. 1, Spalte 5):

Da nach intraperitonealer Applikation von TAPH die Überlebensrate einer behandelten Gruppe nur 10% betrug (Tab. 1, Spalte 9 i), während die Kontrolltiergruppe zu 33,3% überlebte (Tab. 1, Spalte 6 i), wurden CAPH und TAPH in allen anderen Versuchen subkutan injiziert.

Wirkungsvergleich bei unterschiedlicher Dosierung und Wahl von CAPH bzw. TAPH (Tab. 1, Spalte 6 bis 9):

Die Tatsache, daß CAPH im Organismus schnell abgebaut wird, zwingt dazu, das Präparat in 4 Einzeldosen/Tg zu applizieren. Nach Gabe von 2 Einzeldosen/Tg wurde das Tumorwachstum durch CAPH nicht gehemmt: Die Überlebensraten in behandelter Gruppe und Kontrolltiergruppe sind identisch (Tab. 1, Spalte 6 a und 8 a). Die Gabe von CAPH (900 mg/kg/Tg) in 4 Einzeldosen/Tg führte dagegen zu einer Überlebensrate von 93,3% bei den behandelten Tieren gegenüber einer Überlebensrate von nur 6,6% bei den Kontrolltieren (Tab. 1, Spalte 6 b und 9 b).

Wählt man eine kleinere CAPH-Dosis (700 mg/kg/Tg), dann ist die tumorhemmende Wirkung nur unwesentlich geringer: Unter vergleichbaren Bedingungen (verzögerter Behandlungsbeginn) führte eine CAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg zu einer Überlebensrate von 50% (Tab. 1, Spalte 9 c), eine CAPH-

Dosis von 700 mg/kg/Tg führte zu einer Überlebensrate von 40% (Tab. 1, Spalte 7 c); die Kontrolltiere zu den beiden Gruppen gingen alle ein (Tab. 1, Spalte 6 c).

Bei TAPH-behandelten Tieren wurden mit einer Dosis von 700 mg/kg/Tg höhere Überlebensraten erzielt, als mit einer Dosis von 900 mg/kg/Tg: Nach Gabe einer Tumordosis von 2×10^6 Zellen war der tumorhemmende Effekt von 700 mg/kg/Tg TAPH stark genug und die iatrogene Belastung für die Tiere gleichzeitig so gering, daß sie zu 100% (Tab. 1, Spalte 8 e) bzw. 90% (Tab. 1, Spalte 8 g) überlebten, während die Überlebensraten in den Kontrollgruppen bei 11,1% lagen (Tab. 1, Spalte 6 e und 6 g). Die hohen Überlebensraten bei den TAPH-behandelten Tieren wurden mit und ohne Vorbehandlung erzielt!

Auffallend ist, daß bei einer höheren TAPH-Dosis (900 mg/kg/Tg) wie auch bei einer niedrigeren TAPH-Dosis (450 mg/kg/Tg) die Überlebensraten behandelter Tiere bei nur 70% (Tab. 1, Spalte 9 d) bzw. 60% (Tab. 1, Spalte 7 d) liegen.

Die Effektivität der Verwendung TAPHs in einer Dosierung von 700 mg/kg/Tg wird durch das Ergebnis eines weiteren Versuchs unterstrichen, bei dem eine höhere Tumordosis (5×10^6 Zellen) inokuliert wurde: Die Überlebensrate behandelter Tiere lag auch hier noch bei 40% (Tab. 1, Spalte 8 h), während alle Kontrolltiere eingingen (Tab. 1, Spalte 6 h).

Tab. 1

Tumor : balb/c ♀ - meth A

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
geschlecht	tumordosis(x10 ³ zellen)	behandlungsbeginn	behandlungsdauer(in w)	applikationsform	nacl kontrolle	CAFu 700mg/kg/tg. in 4 einzel- dosen	CAFu 900mg/kg/tg. in 2 einzel- dosen	CAFu 900mg/kg/tg. in 4 einzel- dosen
a ♀	2	+2	24	sc	$\frac{\bar{x}}{s}$ 33,3 $\frac{10}{15}$ 9,5	$\frac{\bar{x}}{s}$ 100 (%) $\frac{10}{15}$ 10,5	$\frac{\bar{x}}{s}$ 100 (%) $\frac{10}{15}$ 10,5	$\frac{\bar{x}}{s}$ 100 (%) $\frac{10}{15}$ 10,5
b ♀	2	+3	18	sc	$\frac{\bar{x}}{s}$ 6,6 $\frac{14}{15}$ 11,9			$\frac{\bar{x}}{s}$ 93,3 $\frac{1}{15}$ 35
c ♀	2	-2	14	sc	$\frac{\bar{x}}{s}$ 0 $\frac{10}{10}$ 10	$\frac{\bar{x}}{s}$ 40 $\frac{6}{10}$ 15,6		$\frac{\bar{x}}{s}$ 50 $\frac{5}{10}$ 10,2

Tab. 1 (Fortsetzung) Tumor: Halb/c² - Meth A.

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
geschlecht	Tumordosis (C ² oder)	Behandlungsdauer (in Wk.)	Applikationsform	Wahlkontrolle	WAPH 450mg/kg/Tg. in 2 Einzel- dosen	WAPH 700mg/kg/Tg. in 2 Einzel- dosen	WAPH 900mg/kg/Tg. in 2 Einzel- dosen	
d ♀	2	+2	24	sc	$\frac{H}{U} \frac{H}{U} \frac{H}{U}$ (%) $\frac{10}{15}$ 9,5 24	$\frac{H}{U} \frac{H}{U} \frac{H}{U}$ (%) $\frac{4}{10}$ 24	$\frac{H}{U} \frac{H}{U} \frac{H}{U}$ (%) $\frac{5}{10}$ 28	
e ♂	2	+1	16	sc	11,1		100 $\frac{0}{10}$ -	
f ♀	2	-1	14	sc	6,6 $\frac{14}{15}$ 11,9			60 $\frac{4}{10}$ 31,8
g ♂	2	-1	14	sc	11,1 $\frac{8}{9}$ 13,1		90 $\frac{1}{10}$ 23	
h ♂	⑤	-1	19	sc	0 $\frac{10}{10}$ 10,1		40 $\frac{6}{10}$ 20,5	
i ♀	2	-1	14	⑤ p	33,3 $\frac{7}{10}$ 10,4			10 $\frac{9}{10}$ 22,4

3.2.2 Dimethylbenzanthracen induzierter Tumor C57BL/6 EL4

C57BL/6-Mäusen wurde, obigen Angaben entsprechend, der chemisch induzierte Tumor C57BL/6 EL4 inokuliert. Die Tiere wurden mit CAPH bzw. TAPH behandelt (siehe Tab. 2). Die Beurteilung der Hemmwirkung der verwendeten Präparate auf diesen Tumor stützt sich allein auf den Parameter "mittlere Überlebensdauer ($\bar{Ud}$)", da auch alle behandelten Tiere an den Folgen des Tumorstwachstums eingingen.

Geschlechtsspezifische Unterschiede und Behandlungsbeginn (Tab. 2, Spalte 1 und 3):

Da unterschiedliche Tumordosen verwendet wurden, lassen sich keine Aussagen darüber machen, inwieweit Geschlecht oder Vorbehandlung die Überlebensdauer der Tiere beeinflusste.

Tumordosis (Tab. 2, Spalte 2):

Während bei einer Tumordosis von 10^6 Zellen die mittlere Überlebensdauer behandelter Tiere signifikant ($P < 0,02$) kürzer (!) war als die der Kontrolltiere (Tab. 2, Spalte 7 a und 6 a), trat dieser "inverse" Effekt der TAPH-Behandlung bei der Applikation einer geringeren Tumordosis (10^5 Zellen) nicht wieder auf (Tab. 2, Spalte 7 c und 6 c).

Behandlungsdauer und Applikationsform der Präparate (Tab. 2, Spalte 4 und 5):

Nachdem bei subkutaner Applikation von TAPH alle Tiere noch während der Behandlung eingegangen waren (Tab. 2, Spalte 7 a), wurde in weiteren Versuchen nach 13 Tagen subkutaner Gaben von TAPH bzw. CAPH intraperitoneal weiterspritzt in der Vorstellung, den bereits sichtbaren Aszites der Tiere noch lokal beeinflussen zu können (Tab. 2, Spalte 7 b, 8 b und 9 b). Die Tiere überlebten jedoch trotzdem nicht länger.

Wirkungsvergleich zwischen den verwendeten Präparaten (Tab. 2, Spalte 6 bis 9):

Nach der Inokulation einer Tumordosis von 10^6 Zellen gingen die TAPH-behandelten Tiere früher ein als die Kontrolltiere (Tab. 2, Spalte 6 a und 7a), oder die Üd-Werte in CAPH- bzw. TAPH-behandelten Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich von den Üd-Werten in den betreffenden Kontrollgruppen (Tab. 2, Spalte 7 b, 8 b, 9 b und 6 b). Nach Verminderung der Tumordosis auf 10^5 Zellen lag die mittlere Überlebensdauer einer mit TAPH behandelten Gruppe bei 20,5 Tagen, die der zugehörigen Kontrollgruppe bei 18,6 Tagen (Tab. 2, Spalte 7 c und 6 c). (Der Test auf Signifikanz für den Unterschied zwischen diesen beiden Üd-Werten ergibt $P > 0,3$, d.h. die Wahrscheinlichkeit, daß der Unterschied zwischen den beiden Werten zufallsbedingt ist, liegt über 30%.) Der Unterschied ist nicht signifikant.

Eine weitere Reduzierung der Tumordosis in der Absicht, den wachstumshemmenden Effekt CAPHs bzw. TAPHs im Vergleich zu Kontrollgruppen deutlicher zu machen, ist nicht möglich, da ein Angehen des Tumors im Versuchstier dann nicht mehr gewährleistet ist.

Somit bleibt ein hemmender Effekt CAPHs oder TAPHs auf das Wachstum des Tumors C57BL/6 EL4 *in vivo* fraglich.

Tab.2

Tumor : C57Bl/6 - EL₄

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.
Geschlecht	Tumordosis ($\times 10^6$ Zellen)	Behandlungsbeginn	Behandlungsdauer (in Tg.)	Applikationsform	NaCl Kontrolle	TAPH 900mg/kg/Tg. in 2 Einzel- dosen	CAPH 900mg/kg/Tg. in 2 Einzel- dosen	CAPH 900mg/kg/Tg. in 4 Einzel- dosen
a	♂	1 +3	ad	sc	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$
b	♀	1 +3	$\frac{13}{7}$	sc ip	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$
c	♂	0,1 -1	13	sc	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$	$\frac{\overline{H}}{S}$ $\frac{10}{10}$

3.2.3 Spontan entstandene Leukose BALB/c♀ SL4

BALB/c-Mäusen wurden, obigen Angaben entsprechend, Zellen der spontan entstandenen Leukose BALB/c♀ SL4 inokuliert. Die Tiere wurden mit TAPH, OXAMAT und einer Kombination beider Präparate behandelt (siehe Tab. 3).

Die Beurteilung der Hemmwirkung der verwendeten Präparate auf das Wachstum dieser Leukose stützt sich allein auf den Parameter - mittlere Überlebensdauer (Üd) -, da auch alle behandelten Tiere an den Folgen des Tumorstwachstums eingingen.

Geschlechtsspezifische Unterschiede (Tab. 3, Spalte 1): Die weiblichen Tiere erwiesen sich gegenüber dem Wachstum der Leukose etwas widerstandsfähiger. Sie überlebten länger als die männlichen Tiere, was aus dem Vergleich der Kontrollgruppenergebnisse untereinander hervorgeht (Tab. 3, Spalte 6 a bis 6 f).

Tumordosis (Tab. 3, Spalte 2):

Alle Tiere erhielten eine Dosis von 10^6 Leukosezellen.

Behandlungsbeginn (Tab. 3, Spalte 3):

Durch eine Vorbehandlung der Tiere mit TAPH läßt sich keine Verbesserung der Hemmung des Leukoswachstums erzielen: Die Werte der mittleren Überlebensdauer unterschieden sich zwischen einer Gruppe, die 24 Stunden verzögert behandelt wurde (Tab. 3, Spalte 8 c) und einer Gruppe, die 24 Stunden vorbehandelt wurde (Tab. 3, Spalte 8 b), nur unwesentlich.

Behandlungsdauer (Tab. 3, Spalte 4):

Die mittlere Überlebensdauer BALB/c♀ SL4 Leukose-tragender Tiere nimmt mit einer Verlängerung der Behandlung zu: Tiere, die über 21 Tage nach der Tumorgabe mit TAPH (900 mg/kg/Tg) behandelt wurden, überlebten durchschnittlich 25,1 Tage (Tab. 3, Spalte 8 a), während

eine rund 14tägige Behandlung zu einer mittleren Überlebensdauer von nur 18,3 Tagen (Tab. 3, Spalte 8 b) bzw. 19,1 Tagen (Tab. 3, Spalte 8 c) führte. Zwar wurde die Gruppe 8 a gleichzeitig drei Tage vorbehandelt; da jedoch eine eintägige Vorbehandlung zu keiner Verbesserung der Überlebensdauer führte (Tab. 3, Spalte 8 b), ist anzunehmen, daß die längere Überlebensdauer der Tiere in Gruppe 8 a vorwiegend eine Folge der längeren Behandlungsdauer ist.

Wirkungsvergleich zwischen den verwendeten Präparaten (Tab. 3, Spalte 6 bis 10):

Alle ausschließlich mit OXAMAT behandelten Tiere starben gleichzeitig mit den Kontrolltieren (Tab. 3, Spalte 9 d und 6 d). Die Ergebnisse in den beiden Gruppen sind nahezu identisch und zeigen, daß OXAMAT das Wachstum dieser Spontanleukose *in vivo* nicht hemmt.

Die kombinierte Behandlung mit TAPH (700 mg/kg/Tg) und OXAMAT (1,5 g/kg/Tg) führte nicht zu einer längeren Überlebensdauer als die Behandlung mit derselben TAPH-Dosis allein: Die mittlere Überlebensdauer der kombiniert behandelten Tiere lag bei 13,4 Tagen (Tab. 3, Spalte 10 f), die der allein mit TAPH behandelten Tiere bei 15,2 Tagen (Tab. 3, Spalte 7 e), während die betreffenden Kontrolltiere durchschnittlich 11,2 Tage überlebten (Tab. 3, Spalte 6 e).

Die Verwendung einer hohen TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg führte bei BALB/c μ SL4 Leukose-tragenden Tiere zu signifikant ($P = 0,01$) längeren Überlebenszeiten als die Verwendung einer TAPH-Dosis von 700 mg/kg/Tg: Die mittlere Überlebensdauer lag bei Tieren, die mit 900 mg/kg/Tg behandelt wurden, bei 19,1 Tagen (Tab. 3, Spalte 8 c), während Tiere, die mit 700 mg/kg/Tg behandelt wurden, durchschnittlich nur 15,2 Tage überlebten (Tab. 3, Spalte 7 e). Um eine effiziente Wachstumsverzögerung dieser Leukose im Versuchstier zu erreichen, muß man demnach die TAPH-

Dosis hoch wählen und die Behandlung bis an die Verträglichkeitsgrenze ausdehnen.

3.2.4 Strahleninduzierte Leukose C57BL/6♀ ERLD

C57BL/6♀-Mäusen wurden, obigen Angaben entsprechend, Zellen der strahleninduzierten Leukose C57BL/6♀ ERLD inokuliert. Die Tiere wurden mit TAPH behandelt (siehe Tab. 4).

Die weiblichen Tiere erhielten nach 3tägiger Vorbehandlung 10^6 Leukosezellen intraperitoneal inokuliert.

Daraufhin wurden sie weitere 21 Tage lang mit einer subkutan applizierten TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg behandelt. Die mittlere Überlebensdauer der behandelten Tiere lag bei 25,3 Tagen, die der Kontrolltiere betrug 15,8 Tage (Tab. 4, Spalte 7 a und 6 a). Der Unterschied zwischen den beiden $\bar{U}_d$ -Werten ist statistisch hoch signifikant ($P < 0,001$).

TAPH verzögert demnach das Wachstum der Leukose C57BL/6♀ ERLD, vermag jedoch nicht den letalen Verlauf für die Tiere abzuwenden.

Tab. 4 Tumor: C57BL/6 ♀ - ERLD

	1.	2.	3.	4.	5.	6.			7.		
	Geschlecht	Tumordosis ($\times 10^6$ Zellen)	Behandlungsbeginn	Behandlungsdauer (in Tg.)	Applikationsform	NaCl Kontrolle			TAPH 900mg/kg/Tg. in 2 Einzeldosen		
						$\bar{U}_T$ (%)	$\bar{U}_S$	$\bar{U}_d$ (Tg)	$\bar{U}_T$ (%)	$\bar{U}_S$	$\bar{U}_d$ (Tg)
a	♀	1	+3	24	sc	0	$\frac{10}{10}$	15,8	0	$\frac{10}{10}$	25,3

3.2.5 RAUSCHER-Virus induzierte BALB/c♀ Leukosen

BALB/c-Mäusen wurden, obigen Angaben entsprechend, RAUSCHER-Virus enthaltendes Frischplasma (siehe Tab. 5), bzw. RAUSCHER-Virus induzierte Leukosezellen (siehe Tab. 5a) inokuliert. Die Tiere wurden mit TAPH behandelt.

RAUSCHER-Virus-Plasma induzierte Leukose (Tab. 5, Spalte 1 bis 7):

Die männlichen Tiere erhielten nach einer Vorbehandlung von 5 Tagen 0,25 ml Plasma RAUSCHER-Virus infizierter Tiere inokuliert.

Den Tieren wurde weitere 34 Tage lang eine subkutan applizierte TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg verabreicht. Zum Nachweis einer hemmenden Wirkung TAPHs auf das Wachstum dieser Leukose sei auf die längere Überlebensdauer der behandelten Tiere hingewiesen, da dieser Wert wahrscheinlich größere Aussagekraft hat als die absolute Zahl überlebender Tiere: Die eingegangenen Tiere der behandelten Gruppe überlebten durchschnittlich 60,8 Tage (Tab. 5, Spalte 7 a), die eingegangenen Kontrolltiere nur 47,1 Tage (Tab. 5, Spalte 6 a). Der Unterschied zwischen den beiden $\bar{u}$ -Werten ist statistisch signifikant ($P < 0,02$).

RAUSCHER-Leukosezellen induzierte Leukose (Tab. 5a, Spalte 1 bis 7):

Die weiblichen Tiere erhielten nach einer Vorbehandlung von 3 Tagen 25×10^6 Zellen der RAUSCHER-Virus induzierten Leukose inokuliert.

Die Tiere wurden weitere 21 Tage lang mit einer subkutan applizierten TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg behandelt. Während die Tiere der Kontrollgruppe durchschnittlich 26,9 Tage überlebten (Tab. 5a, Spalte 6 a), betrug die mittlere Überlebensdauer bei den TAPH-behandelten Tiere 37,3 Tage (Tab. 5a, Spalte 7 a). Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant. Alle Tiere starben letztlich an den Folgen des Leukoschwachstums

Tab.5
Tumor:
Balb/c ♀ -
RAUSCHER-
Virus
in
Plasma

	1.	2.	3.	4.	5.	6.			7.		
	Geschlecht	Tumordosis (ml Serum)	Behandlungsbeginn	Behandlungsdauer (in Tg.)	Applikationsform	NaCl Kontrolle			TAPH 900mg/kg/Tg. in 2 Einzel- dosen		
						üT (%)	$\frac{H}{S}$	Üd (Tg)	üT (%)	$\frac{H}{S}$	Üd (Tg)
a	♂	0,25	+5	39	sc	54,4	$\frac{7}{15}$	47,1	40	$\frac{9}{15}$	60,8

Tab.5a
Tumor:
Balb/c ♀ -
RAUSCHER-
Leukose-
Zellen

	"	"	"	"	"	"			"		
	(x10 ⁶ Zellen)					üT (%)	$\frac{H}{S}$	Üd (Tg)	üT (%)	$\frac{H}{S}$	Üd (Tg)
a	♀	25	+3	24	sc	0	$\frac{10}{10}$	26,9	0	$\frac{10}{10}$	37,3

Die Ergebnisse in den beiden Versuchsgruppen lassen nur vermuten, daß TAPH auch das Wachstum RAUSCHER-Virus induzierter BALB/c♀ Leukosen beeinflussen kann.

3.3. Beobachtungen und Versuche, welche auf die immunologische Reaktionsbereitschaft von BALB/c-Mäusen bei CAPH- oder TAPH-Behandlung schließen lassen.

Da CAPH oder TAPH wahrscheinlich auch eine Wirkung auf immunkompetente Zellen haben, wurde bei BALB/c♀ Meth A Tumor-tragenden Tieren dieser Einfluß näher untersucht. Daß die Immunologie bei der natürlichen Abwehr dieses Tumors eine Rolle spielt, geht unter anderem daraus hervor, daß auch Tiere der Kontrollgruppen vereinzelt die Implantation dieses Tumors (in einer Dosierung von 2×10^6 Tumorzellen) überleben (siehe Tab. 1, Spalte 6). Es handelt sich dabei ohne Zweifel um eine immunologische Tumorverwerfung, was unter anderem durch Induktion einer immunologischen Sekundärantwort gezeigt werden konnte.

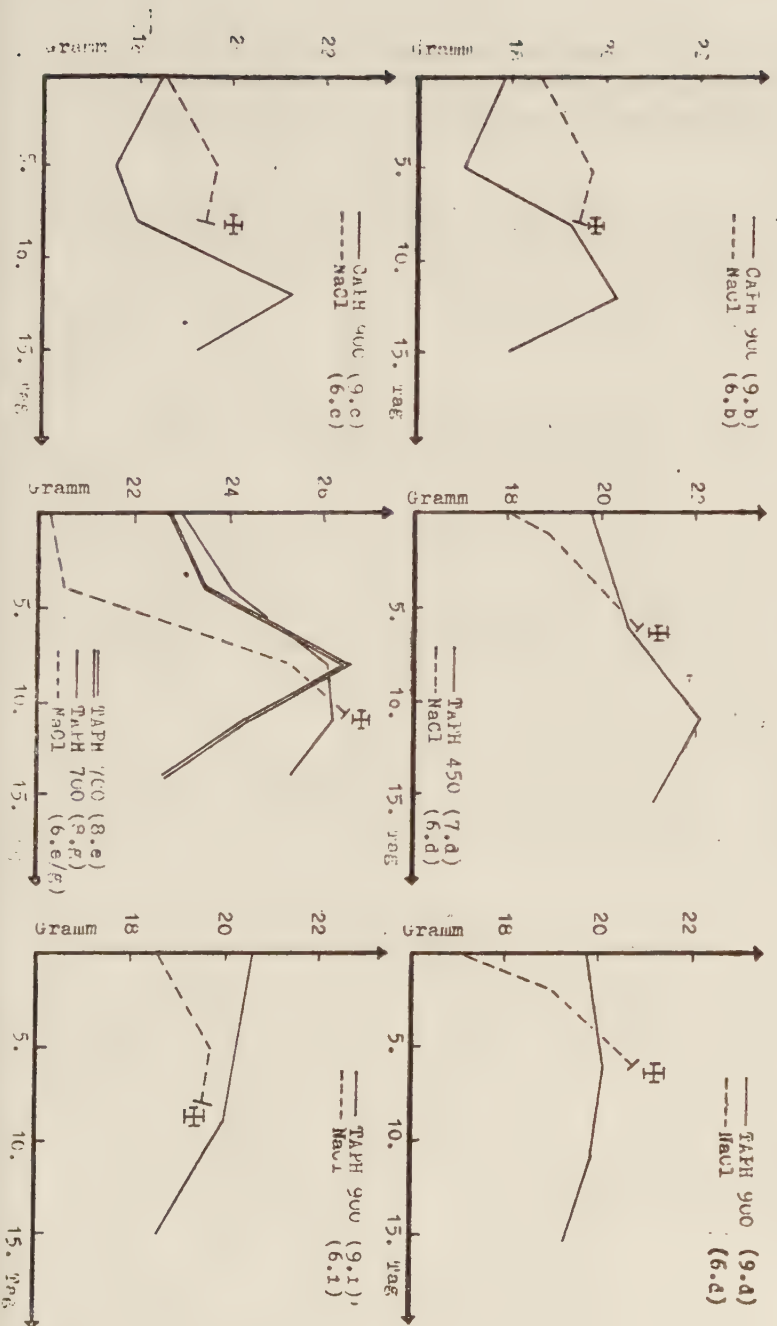
Nachfolgend werden Beobachtungen und Versuche zur Beurteilung der immunologischen Reaktionsbereitschaft von BALB/c-Mäusen bei CAPH oder TAPH-Behandlung angeführt.

3.3.1 Charakteristik der Gewichtsverläufe BALB/c♀ Meth A Tumor-tragender Tiere während der Behandlung

Bei den Gewichtskontrollen während der Versuche mit dem Tumor BALB/c♀ Meth A fiel folgendes auf:

- a) Die Tiere, die mit CAPH (900 mg/kg/Tg) oder TAPH in niedriger Dosierung (450 bzw. 700 mg/kg/Tg) behandelt wurden, zeigten ebenso wie die Kontrolltiere ansteigende Gewichte und entwickelten einen Tumoraszites. Nach Erreichen eines Gewichtsmaximums nahmen sie aber wieder ab und überlebten, während die Kontrolltiere in der Phase ansteigenden Gewichts starben.

Abb. 2: Darstellung des Gewichtsverhaltens wald/c²-meth A-tumortragender Tiere unter der Behandlung mit hohen Dosen UAFH / niedrigen Dosen TAFH / hohen Dosen TAFH



- b) Die Tiere dagegen, die mit einer hohen TAPH-Dosis (900 mg/kg/Tg) behandelt wurden, entwickelten keinen sichtbaren Aszites und nahmen eher an Gewicht etwas ab.

Das unterschiedliche Gewichtsverhalten in Abhängigkeit von Art und Dosierung der tumorhemmenden Präparate ist in Abb. 2 graphisch wiedergegeben.

3.3.2 Messung der Titer humoraler Antikörperbildung ($H2^d$ anti $H2^b$) unter TAPH-Behandlung in unterschiedlicher Dosierung

BALB/c μ -Mäusen ($H2^d$ -Antigen) wurden 10^6 Zellen vom Typ C57BL/6 EL4 ($H2^b$ -Antigen) intraperitoneal inokuliert. Je 5 Tiere wurden danach über 8 Tage mit einer subkutan applizierten TAPH-Dosis von 700 bzw. 900 mg/kg/Tg behandelt. 5 Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung in entsprechender Menge.

Nach 8 Tagen wurden die Tiere einzeln geblutet und mittels des cytotoxischen Tests wurden die Antikörpertiter im Serum gemessen. Die Einzelbestimmungen sind in Abb. 3 zusammengestellt.

Danach wirkt sich eine TAPH-Behandlung in unterschiedlicher Dosierung wie folgt auf die Antikörperbildung (immunologische Primärantwort) bei BALB/c μ -Mäusen aus:

Die Antikörpertiter in Seren der Kontrolltiergruppe lagen konstant bei 1:128. Die Antikörper in Seren der TAPH-700 mg-Gruppe waren mit einem Titerwert von 1:64 bei der Mehrzahl der Tiere gegenüber der Kontrolltiergruppe vermindert. Die Antikörpertiter in Seren der TAPH-900 mg-Gruppe lagen jedoch mit Werten zwischen 1:16 und 1:64 noch tiefer!

Abb. 3: Einzelbestimmung der Titer humoraler Antikörper in BALB/c-Mäusen gegen H2^b-Antigen.

(Als Titer sind jeweils die Serumverdünnungen angegeben, welche ca. 50% trypanblau gefärbte Zellen enthielten)

Behandlung:		TAPH		TAPH	
NaCl		(700mg/kg/Tg)		(900mg/kg/Tg)	
Maus Nr.:	Titer:	Maus Nr.:	Titer:	Maus Nr.:	Titer:
675	1:128	686	1:64	682	1:64
673	1:128	695	1:64	679	1:32
663	1:128	677	1:128	687	1:54
669	1:128	680	1:64	681	1:16
653	1:128	690	1:64	691	1:64

3.3.3 Reaktion der Tiere (immunologische Sekundäranwort) auf eine zweite Tumorzellinokulation sechs Wochen nach der Erstimplantation

Sechs Wochen nach der ersten Tumorumplantation wurde in der Versuchsreihe mit dem Tumor BALB/c♀ METH A allen überlebenden Tieren sowohl der CAPH- bzw. TAPH-behandelten als auch den unbehandelten Tiergruppen eine zweite zehnfach höhere Dosis (2×10^7 Zellen) des Tumors BALB/c♀ Meth A inokuliert.

Alle diese Tiere überlebten ohne äußere Zeichen von Tumorstadium. 10 Tiere, die bislang weder tumorgeimpft noch behandelt worden waren und jetzt ebenso die hohe Tumorzellzahl erhielten, starben sämtlich innerhalb von 9 Tagen.

4. D i s k u s s i o n

Die Ergebnisse dieser Arbeit beweisen, daß das Wachstum verschiedener Sarkome und Leukosen der Maus, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, durch Chloramphenicol (CAPH) oder dessen Derivat Thiamphenicol (TAPH) *i n v i v o* gehemmt werden kann:

Der Methylcholanthren induzierte Tumor BALB/c♀ Meth A wurde durch CAPH (900 mg/kg/Tg) wie auch durch TAPH (700 mg/kg/Tg) in seinem Wachstum so stark gehemmt, daß 93,5% bzw. 100% der behandelten Tiere noch nach drei Monaten ohne Tumorzeichen lebten.

Die spontan entstandene Leukose BALB/c♀ SI4 und die strahleninduzierte Leukose C57BL/6♀ ERLD zeigten beide eine signifikante Wachstumsverzögerung auf die Behandlung mit TAPH (900 mg/kg/Tg) hin. Letztlich starben jedoch alle Tiere dieser Gruppe mit einem Milztumor.

Die Ergebnisse bei Versuchstieren, denen RAUSCHER-Virus induzierte Leukosen inokuliert worden waren, können als Anzeichen dafür gewertet werden, daß TAPH (900 mg/kg/Tg) diese virusinduzierten Leukosen zu beeinflussen vermag.

Der Dimethylbenzanthracen induzierte Tumor C57BL/6 EL4 ließ sich in seinem Wachstum weder durch CAPH- noch durch TAPH-Behandlung beeinflussen.

Die verschiedenen Sarkome und Leukosen zeigen also unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber der Hemmwirkung CAPHs bzw. TAPHs.

In mehreren Arbeiten (8,9,21) konnte gezeigt werden, daß CAPH ohne Einfluß auf die Proliferation von bestimmten Geweben bleibt, obwohl eine Abnahme der Cytochromoxidas-Aktivität in den Zellen dieser Gewebe meßbar ist. Aus der Einwirkung auf proliferierende Zellen ist demnach nicht unmittelbar eine Hemmung ihrer Proliferation

ableitbar. Aus dieser Tatsache heraus könnte auch die unterschiedliche Empfindlichkeit der von uns verwendeten Tumoren gegenüber der Hemmwirkung von CAPH oder TAPH erklärbar sein:

Von spezifischen Stoffwechselfparametern der betroffenen Zellen hängt es ab, ob durch die Hemmung der Cytochromoxidase-Synthese auch die ATP-Synthese und -Reserve und damit die Proliferationsfähigkeit der Zellen beeinflusst werden können. Limitierende Größen sind dabei:

a) die Überschußaktivität der Cytochromoxidase

Die Cytochromoxidase-Aktivität unterscheidet sich von Zellart zu Zellart. Die Cytochromoxidase-Aktivität z.B. in regenerierender Leber ist um ein vielfaches höher als jene im embryonalen Gewebe (21). Nach CHANCE (2) ist die turnover number der Cytochromoxidase mancher Gewebe beträchtlich höher als dies für den Zustand maximaler O_2 -Aufnahme nötig wäre. Man kann das Verhältnis von Atmungsquotient (Q_{O_2}) zu Cytochromoxidase-Aktivität pro Zelle als Maß für die sogenannte Überschußaktivität der Cytochromoxidase einer Zelle nehmen (21).

Bei Geweben und Zellen mit geringer Überschußaktivität der Cytochromoxidase werden ATP-Synthese und Proliferation durch eine Hemmung der Cytochromoxidase-Synthese der Zellen stärker beeinträchtigt als bei Geweben oder Zellen mit hoher Überschußaktivität der Cytochromoxidase.

b) die Halbwertszeit ($t_{1/2}$) der Cytochromoxidase
OERTER (21) fand bei MORRIS-Hepatomgewebe eine gegenüber dem Stammgewebe um das dreifache verkürzte Halbwertszeit der Cytochromoxidase.

Wenn bei maligner Zellentartung die Halbwertszeit der Cytochromoxidase stark verkürzt sein kann, bliebe das nicht ohne Folgen für die Beeinflussbarkeit des Wachstums des entsprechenden Tumors durch CAPH oder TAPH.

c) die Proliferationsgeschwindigkeit

Da unter dem Einfluß von CAPH oder TAPH keine De-novo-Synthese der Cytochromoxidase stattfindet, ist zu erwarten, daß die Cytochromoxidase-Aktivität in Zellen, die der Einwirkung dieser Präparate während mehrerer Mitosen ausgesetzt sind, fortlaufend abfällt. Wird dabei eine bestimmte Cytochromoxidase-Aktivität unterschritten, sistiert die Zellatmung, und das entstehende Defizit an energiereichem Phosphat führt zur Verlangsamung der Zellproliferation. Diesen Zustand erreichen *s c h n e l l* proliferierende Zellen wesentlich rascher als langsam proliferierende, wenn sie unter CAPH oder TAPH wachsen.

d) die glykolytische Aktivität

Energiereiches Phosphat gewinnt die Zelle auf oxidativem, aber auch auf glykolytischem Weg. Fällt das oxidative System aus, so ist der Gesamtstoffwechsel der betroffenen Zelle theoretisch nur insofern beeinträchtigt, als das glykolytische System die Leistung des ausgefallenen oxidativen nicht kompensieren kann.

Um nachzuweisen, daß die eben angeführten Zellparameter tatsächlich für die unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten Tumoren gegenüber CAPH oder TAPH verantwortlich sind, wären folgende Messungen an den von uns verwendeten Tumorzelltypen notwendig:

- a) Messung der Überschußaktivität der Cytochromoxidase (=Verhältnis von Atmungsquotient (q_{O_2}) zu Cytochromoxidaseaktivität pro Zelle)
- b) Messung der Halbwertszeit ($t/2$) der Cytochromoxidase
- c) Auszählen der Zellteilungen pro Zeiteinheit
- d) Messung der glykolytischen Aktivität

Mit der Vorstellung, die glykolytische Aktivität der Tumorzellen hemmen zu können, wurden tumortragende Tiere mit OXAMAT behandelt, einer Substanz, die als Hemmer der Lactatdehydrogenase *in vitro* bekannt ist.

PAPACONSTANTINOU (24,25) beschreibt einen letalen Effekt der Substanz auf HeLa-Zellen und EHRLICH-Asziteszellen *in vitro*. Die Substanz ist *in vivo* nicht toxisch, wird jedoch angeblich sehr schnell wieder ausgeschieden (25).

Wir gingen von der Vorstellung aus, daß CAPH oder TAPH als Hemmer der oxidativen ATP-Synthese und OXAMAT als Hemmer der glykolytischen ATP-Synthese einander in der Hemmung des Tumorwachstums potenzieren könnten.

Die Substanz OXAMAT hatte jedoch *in vivo*, allein, als auch in Kombination mit TAPH appliziert, keinen hemmenden Effekt auf das Wachstum der Leukose BALB/c ϕ SL4.

Um einen gewissen Anhalt für die mitochondrielle Empfindlichkeit der verwendeten Sarkome und Leukosen zu gewinnen, könnte man ferner die Menge der Mitochondrien pro Zellquerschnitt im elektronenmikroskopischen Bild feststellen. Aus deren Zahl läßt sich nicht direkt auf die Aktivität der Cytochromoxidase in den Mitochondrien dieser Tumoren schließen, aber ein erster Hinweis für die spezifische Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber CAPH oder TAPH wäre gegeben.

Die Überlebensrate der behandelten Tiere steht in zweierlei Hinsicht in Beziehung zur Höhe der verwendeten CAPH- bzw. TAPH-Dosis: Einerseits wird mit steigender Dosis der tumorhemmende Effekt im Versuchstier größer, andererseits beeinträchtigen die hohen Dosen der "cytostatisch" wirksamen Substanzen vitale Funktionen des Tierorganismus und setzen damit dessen natürliche Tumoresistenz herab.

Bei den vorliegenden Versuchen wurden bei hohen TAPH-

Dosen größere Gewichtsverluste bei den Tieren beobachtet (bis zu 40% des Ausgangsgewichts). Es traten schleimige Stühle auf und bei der Eröffnung des Situs verendeter Tiere waren neben den Tumorzeichen stark aufgeblähte Darmschlingen zu sehen.

Daß TAPH den Organismus von Versuchstieren schädigen kann, ist in der Literatur mehrmals beschrieben worden: Gewichtsverlust, Anorexie und Alopecie (35), Knochenmarksdepression (12), Veränderungen am Dünndarmepithel, Dyspnoe und Akrozyanose der Tiere (21) traten unter einer Behandlung mit TAPH auf.

Im Zusammenhang damit dürfte auch die Beobachtung stehen, daß eine TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg bei der Behandlung von BALB/c μ Meth A Tumor-tragenden Tieren zu schlechteren Ergebnissen (Überlebensraten zwischen 60 und 70%) führte als eine TAPH-Dosis von 700 mg/kg/Tg (100% Überlebensrate). Demgegenüber konnte bei BALB/c μ SL4 Leukose-tragenden Tieren nur mit einer hohen TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg eine ausreichende Wachstumshemmung, d.h. eine signifikant längere Überlebensdauer der Tiere erzielt werden.

Für verschiedene Tumoren existiert also jeweils eine spezifische TAPH-Dosis mit kleinster Interferenz von gewünschter cytostatischer Wirkung und toxischer Nebenwirkung.

Bei der Behandlung mit CAPH wurden die Versuchstiere in geringerem Maße durch Nebenwirkungen belastet; das Arbeiten mit TAPH ist jedoch insofern von großem Vorteil, als sich mit diesem Präparat aufgrund seiner Pharmakokinetik einfach und sicher ein konstanter Serumspiegel herstellen läßt.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten hohen Überlebensraten bei den BALB/c μ Meth A Tumor-tragenden Tieren sind unter anderem auf die starke Antigenität dieses Tumors zurückzuführen. Nur gegen den Tumor BALB/c μ Meth A aus der Reihe der von uns verwendeten Tumoren und Leukosen konnten spezifische Antikörper in den Seren solcher Maus-

inzuchtstämme nachgewiesen werden, in denen der Tumor ursprünglich auch induziert worden war (32).

Die Beobachtung, daß auch in den K o n t r o l l -
t i e r g r u p p e n BALB/c μ Meth A Tumor-tragender
Tiere einige Mäuse die erste Tumordosis von 2×10^6 Zel-
len überlebten und eine zweite Tumorimplantation in zehnfach
höherer Dosierung ohne äußere Zeichen eines Aszites
verwarfen, läßt auf eine effiziente immunologische Ab-
wehr dieses Tumors schließen.

Kommt eine als Antigen wirksame Substanz (z.B. eine Tu-
morzelle) mit dem immunologischen System eines Organismus
zum ersten Mal in Kontakt, so wird nach den Vorstellungen
der CLONAL SELECTION Theorie eine "passende" Immunobla-
stenpopulation zu heftiger Proliferation angeregt. Durch
schnell ablaufende Teilungen entsteht ein Vielfaches an
Zellen dieses Klon, die als Träger zellulärer oder humo-
raler Antikörper einerseits, als Gedächtniszellen anderer-
seits zur Verfügung stehen. Primärantwort und Gedächtnis-
bildung für weitere Antworten sind also von schnellen
Proliferationsvorgängen kurz nach der Prägung der Zellen
durch das Antigen abhängig. Wir mußten demzufolge befürch-
ten, daß CAPH oder TAPH, deren antiproliferativer Effekt
zur Hemmung von Tumorzellwachstum erwünscht war, damit an-
dererseits die immunologische Reaktion des tumortragenden
Tieres stören könnten.

Die Immunabwehr von Tumorzellen erfolgt in erster Linie
über zelluläre Antikörper. Für verschiedene chemisch in-
duzierte Fibrosarkome konnten Immunreaktionen vom verzö-
gerten Typ bei Meerschweincheninzuchtstämmen nachgewiesen
werden (22).

Es wäre daher angebracht, die Reaktionsfähigkeit der
z e l l u l ä r e n Immunität unter TAPH-Behandlung zu
prüfen. Für den chemisch induzierten Tumor BALB/c μ Meth A
wies STÜCK (32) auch humorale Antikörper nach und konnte
i n v i v o mit Antiseren eine Tumorverwerfung zeigen

(20), so daß die Bedeutung der humoralen Immunität für die Abwehr dieses Tumors außer Zweifel steht.

Da sich nach unserer Beobachtung die Immunreaktion (Primärantwort) von Tieren bei einer TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg bereits deutlich von der bei 700 mg/kg/Tg unterscheidet, ist ein empfindliches System notwendig, um das immunologische Reaktionsvermögen von BALB/c♀-Mäusen bei TAPH-Behandlung zu testen. Die humorale Immunität wurde als Bezugssystem gewählt, da deren Reaktion exakt in Form von Antikörpertitern meßbar ist. Dazu wurde eine Sensibilisierung von BALB/c♀-Mäusen gegen C57BL/6 EL4-Zellen bei gleichzeitiger, unterschiedlich dosierter TAPH-Behandlung durchgeführt. Die Titerwerte der entstehenden Antikörper ($H2^a$ anti $H2^b$) wurden mit Hilfe des cytotoxischen Tests bestimmt: Die Ergebnisse zeigten einerseits, daß die Menge humoraler Antikörper unter dem Einfluß einer TAPH-Behandlung abnimmt und wiesen andererseits darauf hin, daß eine TAPH-Dosis von 700 mg/kg/Tg die humorale Immunität deutlich geringer beeinträchtigt als eine TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg.

Aus Beobachtungen des Gewichtsverhaltens BALB/c♀ Meth A Tumor-tragender Tiere moienen wir ableiten zu können, daß die immunologische Tumoralabwehr auch bei CAPH- bzw. TAPH-behandelten Tieren die Überlebensrate erheblich beeinflußt:

Das Gewichtsverhalten der Tiere (siehe Abb. 2, S. 29) zeigt - abhängig vom verwendeten tumorhemmenden Präparat - charakteristische Verläufe, die sich je nach Dosierung des Präparats unterscheiden. Kontrolltiere, CAPH (900 mg/kg/Tg)- und TAPH (450 bzw. 700 mg/kg/Tg)-behandelte Tiere entwickelten gleichermaßen einen tumorzellhaltigen Aszites mit enormer Gewichtszunahme. Tiere, die mit TAPH (900 mg/kg/Tg) behandelt wurden, zeigten dagegen kein äußerlich sichtbares Asziteswachstum und nahmen eher an Gewicht ab.

Während die Kontrolltiere in der Wachstumsphase des Aszites starben, bildete sich der Aszites der mit TAPH (450 bzw. 700 mg/kg/Tg) oder CAPH (900 mg/kg/Tg) behandelten Tiere nach ca. 10 Tagen wieder zurück und die Tiere überlebten zu 90 bzw. 100%. Ferner geht aus den Gewichtskurven (Abb. 2) hervor, daß sich das Tumorstadium bei TAPH (900 mg/kg/Tg) behandelten Tiere deutlich von dem bei CAPH (900 mg/kg/Tg) unterscheidet. Diese Tatsache unterstreicht erneut die Bedeutung der unterschiedlichen Pharmakokinetik beider Präparate.

Die beschriebene Reversibilität des Asziteswachstums ist nicht durch die cytostatische Wirkung der Präparate allein erklärbar, da der Aszites sonst gar nicht erst aufgeschossen wäre. Wahrscheinlich entsteht er, weil die lokale CAPH- bzw. TAPH-Konzentration nicht ausreicht, um das Tumorstadium vollständig zu hemmen. Die dennoch hohen Überlebensraten bei den Tieren lassen vermuten, daß immunkompetente Zellen geprägt werden, proliferieren und eine effektive immunologische Tumoralabwehr zustandekommt, wenn die Proliferation der Immunzellen weit fortgeschritten ist. Inzwischen besteht ein gewisser cytostatischer Schutz durch CAPH bzw. TAPH, der eine Verzögerung des Tumorzellwachstums bewirkt, jedoch nicht ausreicht, um eine Aszitesentstehung ganz zu verhindern. Zwischen dem 8. und 12. Tag nach Tumoralinokulation beginnt der Aszites zurückzugehen (siehe Abb. 2): die immunologische Tumoralabwehr hat voll eingesetzt. Bei den Kontrolltieren besteht ein cytostatischer Schutz für die ersten Tage nach Tumoralinokulation nicht: Das Asziteswachstum "läuft deshalb ihrer Immunantwort davon".

Hohe Dosen TAPHs (900 mg/kg/Tg) beeinflussen das Tumorstadium wahrscheinlich lokal ausreichend stark, so daß kein Asziteswachstum zustandekommt (siehe Abb. 2). Dabei begrenzen aber die beschriebenen Nebenwirkungen TAPHs den therapeutischen Erfolg.

Der Nachweis humoraler Antikörper und die beschriebene Deutung des Gewichtsverhaltens BALB/c μ Meth A Tumor-tragender Tiere sprechen dafür, daß auch bei einer CAPH- bzw. TAPH-Behandlung der Tiere eine immunologische P r i m ä r antwort gegen Tumorantigene zustandekommt. Daß auch die immunologische S e k u n d ä r antwort bei Tieren, die zur Zeit des ersten Antigenkontakts mit CAPH oder TAPH behandelt wurden, ungestört abläuft, konnte indirekt gezeigt werden: Eine zweite zehnfach höhere Tumordosis, im Abstand von sechs Wochen zur ersten inokuliert, wurde von den Tieren ohne Tumorzeichen verworfen. Daraus geht hervor, daß die Prägung von immunologischen Gedächtniszellen nicht durch CAPH- oder TAPH-Behandlung beeinträchtigt wird, so daß nach erneuter Tumorexposition eine effektive Sekundärantwort entwickelt werden kann.

CRUCHAUD und COONS (3) haben die Primär- und Sekundärantwort von HARVARD-strain-Mäusen auf Diphtherietoxoid bei gleichzeitiger, unterschiedlich dosierter CAPH-Behandlung der Tiere quantitativ gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Zeitspanne zwischen Toxoidgabe und verzögerter CAPH-Gabe wie auch die Höhe der verwendeten CAPH-Dosis von entscheidendem Einfluß auf die Quantität der Primär- und der Sekundärantwort waren: Die Antikörpertiter waren um so geringer je kürzer das Zeitintervall zwischen Toxoidgabe und anschließender CAPH-Gabe war und je höher die CAPH-Dosierung ausfiel.

Für die vorliegenden Versuche folgt daraus, daß die Verzögerung der CAPH- oder TAPH-Behandlung und die Wahl einer möglichst kleinen Präparatdosis, wie sie angestrebt wurden, das Zustandekommen einer effektiven Immunabwehr der Tiere begünstigt.

Die Tatsache, daß exzessives Tumorasziteswachstum (Verdoppelung des Ausgangsgewichts) noch mit dem Leben der Tiere vereinbar und reversibel ist (siehe Abb. 2, S. 29), läßt vermuten, daß der Tod der Tiere nicht eine unmittel-

bare Folge des Asziteswachstum ist. Es ist viel wahrscheinlicher, daß eine Metastasierung in Leber, Milz und ZNS (Streckspasmen vor Eintritt des Todes!) den letalen Verlauf des Tumorstadiums in den Tieren verursacht. Eine histopathologische Untersuchung der aufgeführten Organe im Vergleich zwischen CAPH-(TAPH-)behandelten Tieren und Kontrolltieren könnte dazu den Nachweis und ferner eine Aussage über den Einfluß der cytostatisch wirksamen Präparate auf die Tumormetastasierung bringen.

A u s b l i c k

Vorteile der klinischen Verwendung von CAPH und TAPH:

Die antibakterielle Wirksamkeit beider Präparate ist durch ein breites Wirkungsspektrum gekennzeichnet, das die häufigsten und wichtigsten Keime umfaßt. Da es gelang, das Wachstum schnell proliferierender Warmblüterzellen, z.B. verschiedener Sarkome und Leukosen der Maus in der vorliegenden Arbeit, mit CAPH oder TAPH *in vivo* zu hemmen, könnten die Präparate auch für die klinische Tumorthherapie - etwa der kindlichen Leukosen - interessant werden. Unter diesem Aspekt ist der von uns geführte Nachweis eines aktiven Immunsystems auch bei Einwirkung von CAPH oder TAPH von wesentlicher Bedeutung.

TAPH zeichnet sich gegenüber CAPH dadurch aus, daß es weder an Serumprotein gebunden ist, noch vom Organismus verstoffwechselt wird. Dadurch hat das Präparat die Vorteile, daß es schnell aus dem Blut ins Gewebe übertritt und keine eventuell toxischen Nebenprodukte durch eine Umwandlung im Stoffwechsel auftreten. Es wird ferner behauptet, daß TAPH bei seiner klinischen Anwendung bis heute noch nie zu den irreversiblen Komplikationen der CAPH-Behandlung, einer aplastischen Anämie oder einem Grey-Syndrom geführt hat (6).

Als störender Nebeneffekt beider Präparate gilt ihr depressiver, wenn auch reversibler Einfluß auf das Knochenmark: Erythro-, Leukopoese und Hämoglobin-Synthese sind betroffen.

5. Z u s a m m e n f a s s u n g

In der vorliegenden Arbeit wird die Einwirkung Chloramphenicols (CAPH) und seines Derivats Thiamphenicol (TAPH) - beide als Hemmer der Cytochromoxidase in schnell proliferierenden Warmblüterzellen bekannt - auf das Wachstum verschiedener Sarkome und Leukosen der Maus *i n v i v o* untersucht:

Das Wachstum des Methylcholanthren induzierten Tumors BALB/c φ Meth A in BALB/c-Mäusen wird durch eine Behandlung der Tiere mit CAPH bzw. TAPH gehemmt. 60 bis 100% der behandelten Tiere überleben eine Implantation von 2×10^6 Tumorzellen. Dabei werden die besten Ergebnisse durch 14-tägige Behandlung mit einer TAPH-Dosis von 700 mg/kg/Tg erzielt.

Das Wachstum der spontan entstandenen Leukose BALB/c φ SL4 in BALB/c-Mäusen und der strahleninduzierten Leukose C57BL/6 φ ERLD in C57BL/6-Mäusen wird durch Behandlung der Tiere mit einer hohen TAPH-Dosis von 900 mg/kg/Tg verzögert. Die behandelten Tiere überleben den Zeitpunkt der Leukoseimplantation signifikant länger als die zugehörigen Kontrolltiere.

Aufgrund der wenigen vorliegenden Versuchsergebnisse läßt sich nicht eindeutig beantworten, ob auch das Wachstum der RAUSCHER-Virus induzierten Leukosen in BALB/c-Mäusen durch eine Behandlung mit TAPH beeinträchtigt werden kann. Behandelte Tiere überleben die Leukose- bzw. Virusimplantation im Durchschnitt länger als die Kontrolltiere.

Das Wachstum des Dimethylbenzanthracen induzierten Tumors C57BL/6 EL4 in C57BL/6-Mäusen wird durch CAPH- bzw. TAPH-Behandlung der Tiere nicht gehemmt.

Dieses unterschiedliche Verhalten der Tumoren gegenüber CAPH bzw. TAPH geht parallel zur unterschiedlich starken Antigenität der verwendeten Tumoren.

Da eine immunsuppressive Wirkung CAPHs bzw. TAPHs mehrfach beschrieben ist, werden die immunologischen Reaktionen von BALB/c-Mäusen während einer CAPH- bzw. TAPH-Behandlung bei den vorliegenden Versuchen beobachtet und untersucht:

Aus dem Gewichtsverhalten BALB/c η Meth A Tumor-tragender Tiere geht hervor, daß auch unter einer CAPH- bzw. TAPH-Behandlung eine immunologische Tumorabwehr zustandekommt.

Das Auftreten humoraler Antikörper gegen Zellantigen H2^b in BALB/c-Mäusen während einer TAPH-Behandlung wird nachgewiesen. Eine TAPH-Dosis von 700 mg/kg/Tg beeinträchtigt die Bildung humoraler Antikörper in geringerem Ausmaß als eine Dosis von 900 mg/kg/Tg.

Im Einklang damit stehen hohe Überlebensraten trotz zwischenzeitlich auftretendem Tumoraszites bei Tieren, denen der Tumor BALB/c η Meth A inokuliert worden war, und die mit einer TAPH-Dosis von 700 mg/kg/Tg behandelt wurden.

Der immunsuppressive Effekt CAPHs bzw. TAPHs ist dosisabhängig. Bei entsprechender Dosierung können sich der cytostatische Effekt CAPHs oder TAPHs und die immunologische Abwehr in der Hemmung von Tumorwachstum ergänzen.

6. L i t e r a t u r

- (1) AMBROSE,C.T.; COONS,A.H.: Studies on antibody production
VIII - The inhibitory effect of chloramphenicol on the
synthesis of antibody in tissue culture.
J.Exp.Med. 117, 1075, 1963
- (2) CHANCE,B.: The reactivity of hemoproteins and cytochroms.
The 2. Keilin memorial lecture.
Biochem.J. 103, 1, 1967
- (3) CRUCHAUD,A.; COONS,A.H.: Studies on antibody production
XIII - The effect of chloramphenicol on priming in mice.
J.Exp.Med. 120, 1061, 1964
- (4) DANIEL,T.; SUHLAND,L.G.; WEISBERGER,A.S.: The effect of
chloramphenicol on the anamnestic antibody response to
tetanus toxoid in man.
J.Lab.Clin.Med. 64, 850, 1964
- (5) DOCUMENTA GEIGY, Wissenschaftliche Tabellen, 1955, Basel
- (6) FERRARI,V.: Thiamphenicol - Experimentelle und klinische
Grundlagen eines neuen Antibiotikums.
Deutsche Ausgabe, 1968; ZAMBON S.p.A. - Mailand-Vicenza
- (7) FETTES,J.M.; HALDAR,D.; FREEMAN,K.P.: Effect of chloram-
phenicol on enzyme synthesis and growth of mammalian cells.
Can.J.Biochem. 50, 200, 1972
- (8) FIRKIN,F.C.; LINNANE,A.W.: Differential effect of chlor-
amphenicol on the growth and respiration of mammalian cells.
Biochem.Biophys.Res.Com. 32, 398, 1968
- (9) FIRKIN,F.C.; LINNANE,A.W.: Biogenesis of mitochondria, 8,
The effect of chloramphenicol on regenerating rat liver.
Exp.Cell.Res. 55, 68, 1969
- (10) GORER,P.A.; O'GORMAN,P.: The cytotoxic activity of isoan-
tibodies in mice.
Transplant.Bull. 3, 142, 1956

- (11) HARTMAN, B.K.; PETTINGILL, O.S.; SORENSEN, G.D.:
Chloramphenicol: Effects on mouse myeloma cells in tissue culture.
Science (USA) 165, 297, 1969
- (12) KALTWASSER, J.P.; KHAN, M.H.; LEUSCHER, U.; SIMON, E.;
STILLE, W.; WERNER, E.: The hematotoxic aspects of thiamphenicol. First meeting of the European division of the international society of hematology.
Abstracts S. 136, Milano 1971
- (13) KROON, A.M.: Protein synthesis in mitochondria III. The effects of inhibitors on the incorporation of amino acids into protein by intact mitochondria and digitonin fractions
Biochem.Biophys.A. 108, 275 1965
- (14) KROON, A.M.: Protein synthesis in heart mitochondria I. Amino acid incorporation into the protein of isolated beef heart mitochondria and fractions derived from the sonic oscillation.
Biochem.Biophys.A. 72, 391, 1963
- (15) KUNIN, C.M.; FINLAND, M.: Absorption and urinary excretion of chloramphenicol and 2 analogues, Thiomyccetin and U-15.442 in normal men.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 103, 246, 1960
- (16) LIBERMAN, D.F.; ROTI ROTI, J.L.: Effect of chloramphenicol on the growth and viability of exponentially growing mouse leukemic cells (L5178Y).
Exp.Cell.Res. 77, 346, 1973
- (17) LIBERMAN, D.F.; ROTI ROTI, J.L.; LANGE, C.S.: Specific G-2-phase toxicity of chloramphenicol on mouse leukemic cells (L5178Y).
Exp.Cell.Res. 77, 351, 1973

- (18) MAGER, J.: Chloramphenicol and chlortetracycline inhibition of amino acid incorporation into proteins in a cell-free system from *Tetrahymena pyriformis*.
Biochem. Biophys. A. 38, 150, 1960
- (19) MARTELO, O.J.; MANYAN, D.R.; SMITH, U.S.; YUNIS, A.A.: Chloramphenicol and bone marrow mitochondria.
J. Lab. Clin. Med. 74, No. 6, 927, 1969
- (20) MUZZULINI, B.: Untersuchungen zum Auftreten zellständiger und humoraler Antikörper nach isolierter Immunisierung mit einem chemisch induzierten Fibrosarkom der Maus.
Inaugural-Dissertation, Universitätskinderklinik der FU Berlin, 1971
- (21) OERTER, D.: Einfluß von Chloramphenicol und Oxytetracyclin auf die Cytochromoxidaseaktivität verschieden schnell proliferierender Gewebe.
Inaugural-Dissertation, Pharmakologisches Institut der FU Berlin, 1973
- (22) OETTGEN, H.F.; OLD, L.J.; MCLEAN, E.P.; CARSWELL, E.A.: Delayed hypersensitivity and transplantation immunity elicited by soluble antigens of chemically induced tumours in inbred guinea-pigs.
Nature 220, No. 5164, 295, 1968
- (23) OLD, L.J.; BOYSE, E.A.; CLARKE, D.A.; CARSWELL, E.A.: Antigenic properties of chemically induced tumors.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 101, 80, 1962
- (24) PAPACONSTANTINOU, J.; COLOWICK, S.P.: The role of glycolysis in the growth of tumor cells I: Effects of oxamic acid on the metabolism of EHRLICH ascites tumor cells in vitro.
J. Biol. Chem. 236, 278, 1961
- (25) PAPACONSTANTINOU, J.; COLOWICK, S.P.: The role of glycolysis in the growth of tumor cells II: The effect of oxamic acid on the growth of HeLa cells in tissue culture.
J. Biol. Chem. 236, 281, 1961

- (26) PESTKA, S.: General inhibitors of ribosome function.
Ann.Rev.Microbiology, 25, 487, 1971
- (27) PETRESCU, E.; MARCA, G.; VERONESE, M.: Humoral antibody production following primary and secondary immunization in rabbits treated with thiamphenicol and chloramphenicol
Chemotherapy 17, 200, 1973
- (28) RENDI, R.: The effect of chloramphenicol on the incorporation of labeled amino acids into proteins by isolated subcellular fractions from rat liver.
Exp.Cell.Res. 18, 187, 1959
- (29) ROODYN, D.B.; REIS, P.J.; WORK, T.S.: Protein synthesis in mitochondria. Requirements of the incorporation of radioactive amino acids into mitochondrial protein.
Biochem.J. 80, 9, 1961
- (30) SCHOENBERG, M.D.; MOORE, R.D.; WEISBERGER, A.S.: Differentiation and functional expression of potential antibody producing cells in the presence of chloramphenicol.
J.Cell.Biol. 32, 401, 1967
- (31) SO, A.G.; DAVIE, E.W.: The incorporation of amino acids into protein in a cell-free system from yeast.
Biochemistry 2, 132, 1963
- (32) STÜCK, B.: Nachweis humoraler Antikörper nach isolierter Immunisierung mit einem chemisch induzierten Fibrosarkom der Maus.
Zeitschrift f. Krebsforschung 69, 236, 1967
- (33) SVEHAG, S.E.: Antibody formation in vitro by separated spleen cells: Inhibition by actinomycin and chloramphenicol.
Science (USA) 146, 659, 1964
- (34) WEISBERGER, A.S.; WESSLER, S.; AVIOLI, L.V.: Mechanism of action of chloramphenicol.
J.A.M.A. 209, 97, 1969

- (35) WEISBERGER, A.S.; DANIEL, T.N.: Suppression of antibody synthesis by chloramphenicol analogs.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 131, 570, 1969
- (36) ZELKOWITZ, L.; ARIMURA, G.K.; YUNIS, A.A.: Chloramphenicol and protein synthesis in mammalian cells.
J.Lab.Clin.Med. 71, 596, 1968

Herzlichen Dank Herrn Professor Stück,
Frauke Oberbeck und Detlef Oerter.

Michael Weizsäcker

- 1948 Am 26. August 1948 als Sohn des Kaufmanns Wilhelm Weizsäcker und seiner Ehefrau Ulla geb. Lundt in Schwäbisch Gmünd geboren.
- 1955 Besuch der Grundschule in Schwäbisch Gmünd
- 1959 Besuch des Parlergymnasiums Schwäbisch Gmünd
- 1967 Abitur am Parlergymnasium
- 1969 Sommersemester: Studium der germanistischen und romanistischen Sprachwissenschaft an der Universität München
- 1969 Wintersemester: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Freiburg im Breisgau
- 1970 Vorphysikum an der Universität Freiburg im Breisgau
- 1972 Physikum an der Universität Freiburg im Breisgau
- 1972 Fortsetzung des Studiums an der Freien Universität Berlin
- 1975 Ärztliches Staatsexamen an der Freien Universität Berlin
- 1975/ 76 Medizinalassistent an der Inneren Abteilung des Städt. Behring-Krankenhauses in Berlin

